

# AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE PROBIÓTICOS EM QUEIJO DE CABRA TIPO BOURSIN

MILLA N. A. DO AMARAL<sup>1</sup>; ALCINA M. LISERRE<sup>2</sup>, LUCIANA R. MONTEIRO<sup>5</sup>,  
FLAVIA C. A. BURITI<sup>4</sup>, LINCOLN S. GONÇALVES<sup>5</sup>, PATRÍCIA B. ZACARCHENCO<sup>3</sup>,  
IZILDINHA MORENO<sup>3</sup>, KARINA M. O. DOS SANTOS<sup>4</sup>

Nº 10233

## RESUMO

Neste trabalho foram produzidos queijos com leite de cabra e probióticos para avaliação da resistência desses microrganismos durante o tempo de estocagem e após a passagem pelo trato gastrointestinal simulado. Os queijos foram adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e após 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem refrigerada submetidos à avaliação microbiológica com MRS preparado com maltose e incubação em anaerobiose a 43°C por 72h. O suco gástrico foi simulado com solução pH 2,5 e adicionado de pepsina (3g/L). O suco entérico, com a adição de bile (3g/L), foi simulado com pH 5,6 e 7,5, de acordo com as condições do sistema intestinal humano. As contagens totais médias de *L. acidophilus* para o queijo após 7, 14, 21 e 28 dias foram 7,74, 6,97, 5,39 e 5,33 logUFC/g respectivamente. Considerando para consumo porção diária de 30g de queijo, obtém-se um total de aproximadamente 10<sup>8</sup> células apenas nas duas primeiras semanas, o que indica que a concentração de células só atende às exigências da legislação brasileira para alimentos com alegações funcionais na primeira e segunda semana. Após o ensaio em condições simuladas do sistema gastrointestinal, as populações de lactobacilos foram reduzidas a 2,65 logUFC/g após 7 dias de estocagem, e em contagens inferiores ao limite de detecção do teste ( $\leq 2,00$  logUFC/g) para os queijos após 14, 21 e 28 dias. Verifica-se que as contagens do probiótico após ação de suco gástrico e entérico formulados com pepsina e bile foram reduzidas em aproximadamente 5 ciclos logarítmicos nas duas primeiras semanas, apesar da contagem inicial do queijo estar de acordo com a legislação brasileira, ou seja, acima de 10<sup>8</sup> UFC por porção diária.

**Palavras-chave:** probiótico, queijo de leite de cabra, *Lactobacillus acidophilus*, suco gástrico, suco entérico

---

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Estagiário, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, millanogueira06@gmail.com

<sup>2</sup> Orientador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, alcina.maria@ital.sp.gov.br

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

<sup>4</sup> Colaborador: Pesquisador, EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, Sobral-CE

<sup>5</sup> Colaborador: Estagiário, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

## SUMMARY

In this study, goat milk cheeses with probiotic were produced and the survival of these bacteria after simulated conditions of human gastrointestinal tract was evaluated. The cheeses were added of *Lactobacillus acidophilus* and subjected to microbiological evaluation after 7, 14, 21 and 28 days with MRS prepared with maltose and incubated anaerobically at 43°C for 72h. The gastric juice at pH 2.5 was added of pepsin (3g/L). The enteric juice added of bile (3g/L) was simulated with pH 5.6 and 7.5 according to the conditions of the duodenum, jejunum, ileum, and the large intestine. The counts of *L. acidophilus* in the cheeses kept at 7, 14, 21 and 28 days, were respectively 7.74, 6.97, 5.39 e 5.33 log CFU/g. These results show that the portion of 30g of cheese contains  $10^8$  cells only at 7 and 14 days, which indicates that the concentration of cells only agree to the Brazilian legislation requirement related to the functional foods in the first and second weeks. After the assays simulating gastrointestinal conditions, the population of *L. acidophilus* were reduced to 2.65 after 7 days of storage, and were lower than the detectable limit of the test ( $\leq 2.0$  log CFU/g) for cheeses after 14, 21 and 28 days. It was observed that the population of probiotics after simulated conditions of gastric and enteric juices formulated with pepsin and bile, respectively, was reduced in approximately five logarithmic cycles in the first two weeks, despite the initial counts attend to the Brazilian legislation requirements.

**Key words:** probiotic, goat milk cheese, *Lactobacillus acidophilus*, gastric juice, enteric juice

## INTRODUÇÃO

A incorporação de atributos de saúde adicionais aos alimentos é uma oportunidade de negócio, devido à expansão do mercado de alimentos funcionais e ao alto valor agregado desses produtos. No segmento de funcionais, a adição de probióticos é importante inovação no desenvolvimento de novos produtos. A introdução de culturas probióticas em queijos os coloca como veículos promissores desses microrganismos. Comparando aos leites fermentados, os queijos apresentam características físico-químicas que favorecem a manutenção da viabilidade dos probióticos, tais como pH mais alto, menor conteúdo de oxigênio e maior estabilidade do meio na estocagem (BOYLSTON *et al.* 2004). A legislação brasileira reconhece vários probióticos e, entre eles, o *L. acidophilus* (BRASIL 2008). Caso o produto seja registrado, é autorizada a inserção de alegações de efeito sobre a saúde na rotulagem de produtos que apresentam concentrações superiores a  $10^8$  células por porção diária de consumo até

o final de seu prazo de validade. Desenvolver um queijo probiótico depende, portanto, da garantia da viabilidade dos probióticos no processamento, maturação e estocagem (STANTON *et al.* 2001). Por isto, é importante monitorar a contagem das bactérias e demais características do produto. Deve-se considerar também que o efeito dos probióticos está diretamente relacionado com a sua atividade no trato digestivo, e esta depende de sua sobrevivência nesse ambiente, por isso essas bactérias devem ser resistentes aos processos fisiológicos e físico-químicos do trato gastrointestinal (GI). O desenvolvimento de queijo potencialmente probiótico a partir de leite de cabra justifica-se em função do potencial de mercado, do alto valor agregado atribuído aos alimentos funcionais e da possibilidade de inserção de produtos lácteos caprinos nesse segmento.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em queijo tipo “Boursin” de leite de cabra e a sobrevivência deste microrganismo em simulação da passagem pelo trato gastrointestinal humano, após 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem sob refrigeração.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Produção dos queijos de leite cabra experimentais e contagem de *Lactobacillus acidophilus***

Os processamentos dos queijos de cabra foram realizados na usina de processamento de leite da Embrapa Caprinos. O probiótico usado foi *L. acidophilus* (DVS, Chr. Hansen). Ao leite pasteurizado adicionou-se cloreto de cálcio (2,5g/10L de leite), 1% de *L. acidophilus* (Chr. Hansen) e coagulante (Chr. Hansen, 0,1 mL/L de leite). O leite foi então homogeneizado e encaminhado para fermentação à temperatura ambiente por cerca de 15 horas. Ocorrida a coagulação, foi realizada a dessoragem em sacos de algodão previamente esterilizados, a 120°C. Após um período de descanso sob refrigeração, a massa resultante recebeu adição de sal (0,5%) e foi embalada em recipientes de vidro, sendo em seguida encaminhada para estocagem a 10°C. Foram realizadas 3 repetições dos processamentos dos queijos.

As análises para contagem de *L. acidophilus* foram realizadas em triplicata. Porções de 25g de queijo coletadas aleatoriamente com 7, 14, 21 e 28 dias, período estimado de vida de prateleira do produto, foram homogeneizadas em água peptonada 0,1% e submetidas a diluições decimais. A quantificação de *L. acidophilus* nas amostras dos queijos foi realizada através da transferência de alíquotas de 1mL para placas de Petri,

seguida da adição de Agar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) preparado como meio basal contendo maltose e incubação em anaerobiose a 43°C por 72h (BURITI, 2005).

#### **Avaliação da sobrevivência de bactérias probióticas no queijo de coalho após ação de suco gástrico e entérico formulados com pepsina e bile**

A sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* no queijo tipo boursin foi avaliada em sucos gástrico e entérico simulados após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado, utilizando-se pepsina e sais de bile (SALLANS *et al.*, 1988 GANZLE *et al.*, 1999, LISERRE *et al.*, 2007).

Para a amostragem, 25g de queijo foram dissolvidos em 225ml de água peptonada 0,1%. Uma alíquota de 1mL desta mistura foi adicionada à solução ácida pH 2,5, contendo pepsina (3g/L), e incubada a 37°C em *shaker* por 120 min com agitação de 150 RPM. Em seguida, o pH foi alterado para 5,6 por mais 120 minutos e, finalmente, alterado para pH 7,5 pelos últimos 120 minutos. Nas etapas de simulação dos fluidos entéricos também adicionou-se bile (Oxoid) na proporção de 3g/L. O experimento totalizou 6 horas de ensaio. Para cada tratamento foram realizadas três repetições. Para a contagem de bactérias probióticas, foram retiradas alíquotas em intervalos pré-definidos de 120 minutos para pH 2,5, 5,6 e 7,5. A contagem de *L. acidophilus* foi realizada conforme descrito anteriormente.

#### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As contagens médias de *L. acidophilus* obtidas durante o período de armazenamento podem ser observadas na tabela 1 e figura 1. Nota-se que as populações foram de aproximadamente 7,74 e 6,97 logUFC/g nas duas primeiras semanas de estocagem refrigerada. Todavia, com o início da terceira e da quarta semana a população foi reduzida para 5,39 e 5,33 logUFC/g, respectivamente, cuja diferença foi significativa em relação às duas primeiras semanas.

**Tabela 1:** Análise estatística das populações (logUFC/g) médias de *L. acidophilus* em queijo tipo Boursin de leite de cabra após simulação do sistema gastrointestinal humano com 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem e durante estocagem de 28 dias em temperatura de refrigeração.

Tempo (dias)	7	14	21	28
<b>Contagem total</b>	7,74±0,15 <sup>aA</sup>	6,97±0,03 <sup>aA</sup>	5,39±0,68 <sup>aB</sup>	5,33±0,81 <sup>aB</sup>
<b>pH 2,5</b>	4,53±0,09 <sup>bA</sup>	4,02±0,43 <sup>bB</sup>	2,56±0,09 <sup>bC</sup>	2,38±0,39 <sup>bC</sup>
<b>pH 5,6</b>	3,10±0,17 <sup>cA</sup>	2,42±0,10 <sup>cB</sup>	2,16±0,28 <sup>bB</sup>	2,10±0,21 <sup>bB</sup>
<b>pH 7,5</b>	2,65±0,16 <sup>dA</sup>	≤2,00 <sup>B</sup>	≤2,00 <sup>B</sup>	≤2,00 <sup>B</sup>

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúsculas oferecem a comparação vertical dentro do período entre os tratamentos; e, por letras maiúsculas, a comparação horizontal dentro do tratamento entre os períodos de armazenamento.

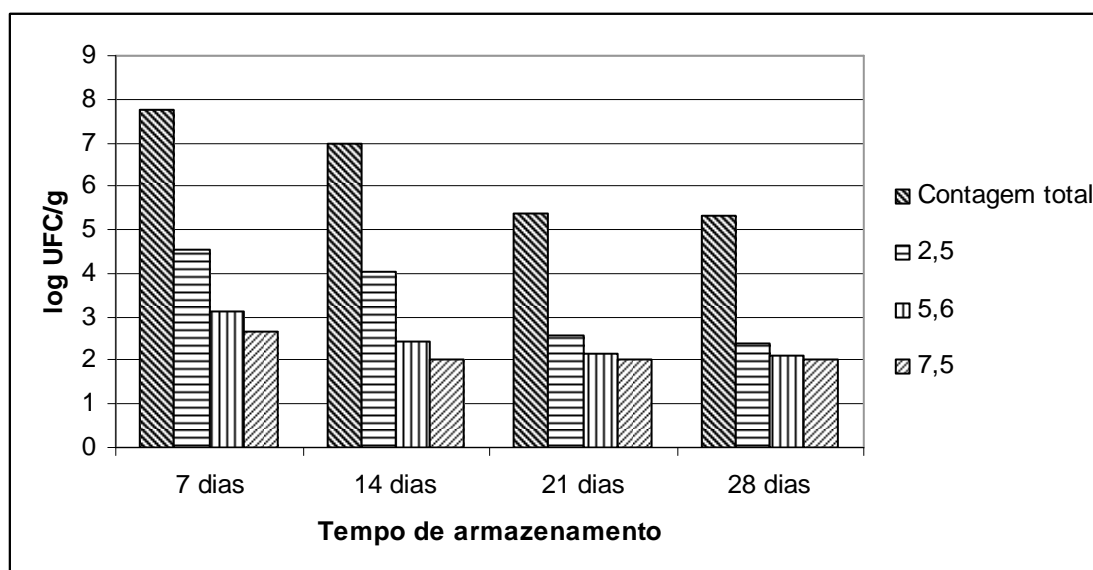
Considerando para consumo uma porção diária de aproximadamente 10g a 100g de queijo, obtém-se um total de  $10^8$  células por até 14 dias de estocagem, o que está de acordo com as exigências da legislação brasileira para alimentos com alegações funcionais (BRASIL 2008). Considerando ainda que pela rotulagem do produto indica-se uma porção diária de 30g, mesmo com um consumo menor, de 10g, ainda será obtida a concentração mínima de microrganismos para a manutenção do efeito probiótico neste período. Entretanto, os queijos armazenados por 21 ou 28 dias apresentaram contagens inferiores a 6 ciclos logarítmicos e, por isso, não atenderam a legislação vigente.

As contagens de populações sobreviventes à passagem pelo sistema gastrointestinal e contagem inicial podem ser observadas na Figura 1. Nota-se que após 120 minutos em solução gástrica com pH 2,5 e pepsina (3g/L), obteve-se contagens de 4,54, 4,0, 2,56 e 2,38 logUFC/g para os queijos com 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente. Com o início do ensaio nos sucos entéricos após a passagem pelo suco gástrico, as populações foram significativamente reduzidas, com obtenção de contagens na ordem de 3,1, 2,42, 2,16 e 2,10 logUFC/g após duas horas em pH 5,6, no mesmo período e de 2,65 e abaixo do limite de detecção do teste ( $\leq 2,0$  logUFC/g) após 2 horas em pH 7,5, com 7 dias de estocagem e com até 28 dias, respectivamente. Este fato demonstra o quanto o *Lactobacillus acidophilus* inoculado nos queijos foi sensível à exposição de sais biliares. A etapa com pH 5,6 simula a entrada do alimento no duodeno enquanto a etapa com pH 7,5 simula a passagem para o jejuno, íleo e intestino grosso. Considerando as populações iniciais de *L. acidophilus* nos queijos, houve uma redução de até 5 ciclos logarítmicos após o ensaio de simulação da passagem pelo trato gastrointestinal. Segundo Kurmann e Rasic (1991), a

sobrevivência de  $10^6$  UFC/g é suficiente para exercer os efeitos benéficos à saúde, o que comprova que o queijo não apresentou população final adequada para a veiculação de probióticos após a simulação do sistema gastrointestinal, embora a presença de gordura seja uma proteção para passagem pelo trato gastrointestinal. O valor do pH do queijo ao longo da vida de prateleira manteve-se em média de 4,2, o que pode ter influenciado na sobrevivência dos lactobacilos após os testes.

Estudos posteriores ainda devem ser realizados, pois poucos são os trabalhos que alegam qual é a população mínima para o efeito probiótico após a passagem pelos sistemas simulados, e também deve-se considerar que a contagem total de lactobacilos nestas amostras antes dos testes *in vitro* estava de acordo com a legislação brasileira para alimentos funcionais, pelo menos até a segunda semana (BRASIL, 2008). Atualmente, a legislação brasileira exige que as culturas utilizadas em alimentos funcionais sejam resistentes às condições gástricas e à presença de bile, mas não especifica qual a redução máxima aceitável após a realização destes testes. Diversos autores relatam que as bactérias probióticas são sensíveis a acidez e a bile em maior ou menor grau em função do gênero e espécie, sendo raras as que sobrevivem integralmente após os testes simulados com sucos gástricos e entéricos (TRUELSTRUP HANSEN *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2004; COLLADO *et al.*, 2006).

Em estudo prévio para avaliação da resistência de probiótico em queijo de coalho com leite de cabra feito por Chaves *et al.* (2009), com metodologia semelhante ao do presente trabalho, observou-se a presença de populações de *L. acidophilus* 7,03 e 7,04 logUFC/g nos queijos após armazenagem refrigerada por 15 e 30 dias respectivamente, o que está de acordo com as exigências da legislação brasileira para alimentos com alegações funcionais (BRASIL 2008). Após a passagem simulada pelo sistema gastrointestinal obteve-se contagens de 3,79 e 4,33 logUFC/g para 15 e 30 dias de estocagem, respectivamente, o que comprova que o queijo tipo coalho também não apresentou população final adequada para a veiculação de *L. acidophilus* após a simulação do sistema gastrointestinal. Esse resultado indica também a alta sensibilidade de *L. acidophilus* à exposição de sais biliares.



**Figura 1.** Populações médias (logUFC/g) de *B. animalis* em queijo tipo boursin após passagem por fluidos simulados do trato gastrointestinal com 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem e durante estocagem de 28 dias em temperatura de refrigeração.

## CONCLUSÕES

A fabricação de queijo de leite de cabra com *L. acidophilus* é viável tecnologicamente, com a obtenção de contagens de acordo com a legislação por até 14 dias de estocagem. Por outro lado, as células de *L. acidophilus* não foram recuperadas no limite de detecção do teste ( $\leq 2$  logUFC/g) após a simulação dos sucos gástrico e entérico com sais de bile, apresentando redução de até 5 ciclos logarítmicos.

## AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo auxílio financeiro ao projeto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOYLSTON, T.D., VINDEROLA, C.G., GHODDUSI, H.B., REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy J.* v.14, p.375-387, 2004.
2. BRASIL. ANVISA. **VIII - Lista das Alegações Aprovadas**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acesso em 15 ago. 2009.

3. BURITI, F.C.A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, São Paulo, 2005.
4. CHAVES, G. M., LISERRE, A. M., ZACARCHENCO, P. B., SANTOS, K. M. O., MORENO, I. **Simulação do sistema gastrointestinal humano para avaliação da resistência de probiótico em queijo de coalho com leite de cabra.** Anais do 3º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2009, 6 a 7 de agosto de 2009. Campinas/SP. 6 páginas.
5. COLLADO, M. C., MERILUOTO, J., SALMINEN, S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. **Food Research International.** v.15 n.4, p.570-575, 2006.
6. GÄNZLE, G.G., HERTEL, C., VOSSEN, J.M.B.M., HAMMES, W.P. **Effect of bacteriocinproducing lactobacilli on the survival of Escherichia coli and Listeria in a dynamic model of the stomach and the small intestine.** *Int. J. of Food Microbiology*, v.48, p. 21–35, 1999.
7. KURMANN, J. A., RASIC, J. L., **The health potential of products containing bifidobacteria.** In R. K. Robinson (Ed.), Therapeutic properties of fermented milks(pp.117-158), 1991. London, UK. Elsevier.
8. LISERRE, A.M.; FRANCO,B.D.G.M; RÉ, M.I. **Microencapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. lactis in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions.** *Food Biotechnology*, v. 21, p. 1-16, 2007.
9. SALLANS, F. RODRIGUEZ, F., SABLAYROLLES, B., COMBES, A., PATAU, J.P., ROUFFIAC. R. Etude comparative de cinq specialties de théophylline a liberation prolongée. **Journal de Pharmacie Belgique** 43:81–87. 1988.
10. STANTON, C., GARDINER, G., MEEHAN, H., COLLINS, K., FITZGERALD, G., BRENDAN LYNCH, P., ROSS, R.P. Market potential for probiotics. **Am. J. Clinical Nutrition** v.73, p.476-483, 2001.
11. TAKAHASHI, N., XIAO, J. Z., MIYAJI, K., YAESHIIMA, T., HIRAMATSU, A., IWATSUKI, K.,. Selection of acid tolerance of bifidobacteria and evidence for a low –pH-inducible and acid tolerance response in Bifidobacterium longum. **Journal of Dairy reasearch**, 71, 340-345, 2004.
12. TRUELSTRUP HANSEN, L., ALLAN-WOJTAS, P. M., JIN, Y. L., PAULSON, A. T., Survival of Ca-Alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. And simulated gastrointestinal conditions. **Journal of food microbiology**, 19, 35-45, 2002.